



(11) **EP 3 348 649 A1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
18.07.2018 Patentblatt 2018/29

(51) Int Cl.:
C12Q 1/56^(2006.01) G01N 33/86^(2006.01)

(21) Anmeldenummer: **17151547.1**

(22) Anmeldetag: **16.01.2017**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR**
Benannte Erstreckungsstaaten:
BA ME
Benannte Validierungsstaaten:
MA MD

(71) Anmelder: **Siemens Healthcare Diagnostics
Products GmbH
35041 Marburg (DE)**

(72) Erfinder: **Zander, Norbert
35039 Marburg (DE)**

(54) **UNIVERSALES KONTROLLMATERIAL FÜR GERINNUNGSFAKTORINHIBITOR-TESTE**

(57) Die vorliegende Erfindung liegt auf dem Gebiet der Gerinnungsdiagnostik und betrifft ein universales Kontrollmaterial, dessen Herstellung und dessen Verwendung zur Qualitätskontrolle von Gerinnungsfaktorinhibitor-Testen.

EP 3 348 649 A1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung liegt auf dem Gebiet der Gerinnungsdiagnostik und betrifft ein universales Kontrollmaterial, dessen Herstellung und dessen Verwendung zur Qualitätskontrolle von Gerinnungsfaktorinhibitor-Testen.

[0002] Das Blutgerinnungssystem (Hämostase) erfüllt die Aufgabe, einerseits eine kontinuierliche Strömung des Blutes zu gewährleisten und andererseits im Falle einer Verletzung rasch und lokal einen Wundverschluss herbeizuführen, um einen Blutverlust zu minimieren. Die Fibrinbildung, die zur Bildung der wundverschließenden Blutgerinnsel beiträgt, steht am Ende einer Kaskade enzymatischer Prozesse, wobei jedes Enzym ein weiteres Enzym durch proteolytische Prozesse aktiviert. Beispiele für solche prokoagulatorischen Enzyme sind Thrombin (Faktor IIa) und Faktor Xa. Sowohl bei Thrombin als auch bei Faktor Xa handelt es sich um Serinproteasen, die normalerweise in Form von inaktiven Proenzymen im Blut vorkommen und erst im Zuge der Gerinnungsaktivierung aktiviert werden.

[0003] In der Antikoagulationstherapie werden zunehmend neue direkte Gerinnungsfaktorinhibitoren, insbesondere direkte Thrombin-(Faktor IIa-) und Faktor Xa-Inhibitoren eingesetzt. Diese neuen Gerinnungshemmer haben das Potenzial, die bislang benutzten indirekten Gerinnungshemmer, vor allem Heparin und dessen Derivate, die ihre gerinnungshemmende Wirkung nur im Zusammenspiel mit Kofaktoren wie Antithrombin oder Heparin Cofaktor II entfalten, abzulösen. Für die Steuerung der Therapie und die Dosierung der Medikamente ist es daher wichtig, die Menge des therapeutischen Inhibitors zu kennen. Es ist daher notwendig, über diagnostische Methoden zu verfügen, die es ermöglichen, die Plasmakonzentrationen der therapeutischen Inhibitoren quantitativ zu bestimmen.

[0004] Im Stand der Technik sind verschiedene Testverfahren zum quantitativen Nachweis von direkten Thrombin- bzw. direkten Faktor Xa-Inhibitoren in humanen Plasmaproben bekannt.

[0005] Die Bestimmung von Thrombin- bzw. von Faktor Xa-Inhibitoren erfolgt üblicherweise mit Hilfe chromogener oder koagulometrischer Testverfahren. Bei den chromogenen Verfahren wird die Patientenprobe, die einen Thrombin- bzw. Faktor Xa-Inhibitor vermutlich enthält, mit einer sich im Überschuss befindlichen, definierten Menge des entsprechenden aktivierten Gerinnungsfaktors und einem chromogenen Substrat für den aktivierten Gerinnungsfaktor vermischt, und die im Reaktionsansatz verbleibende Aktivität des Gerinnungsfaktors wird photometrisch gemessen. Bei den etablierten, auch kommerziell erhältlichen chromogenen Testen werden insbesondere die Chromophore para-Nitroanilin (pNA) und 5-Amino-2-Nitro-Benzoessäure (ANBA), welche ein Absorptionsmaximum bei 405 nm aufweisen, verwendet. Die entstehende gelbe Farbe wird in der Regel photometrisch bestimmt. Je höher die Konzentration des therapeutischen Inhibitors in der Patientenprobe ist, desto mehr wird die Aktivität des zugegebenen Gerinnungsfaktors gehemmt und desto weniger Substrat wird gespalten. Bei der Bestimmung von Inhibitoren verhält sich die Farbkonzentration im Testansatz umgekehrt proportional zur Inhibitorkonzentration in der Probe. Beispielsweise in EP-B1-0034320 oder in EP-A2-0004271 sind derartige Thrombin- bzw. Faktor Xa-basierte, chromogene Testverfahren beschrieben. Mit Hilfe dieser Tests können therapeutische Inhibitoren, die die Aktivität von Blutgerinnungsfaktoren inhibieren, in Patientenproben quantitativ bestimmt werden. In der WO-A1-2012069139 ist ein Verfahren zur Bestimmung von Faktor Xa-Inhibitoren und in der WO-A1-2012175183 ein Verfahren zur Bestimmung von Thrombininhibitoren in Serum- und Urinproben beschrieben.

[0006] Eine zunehmende Zahl von direkten Thrombin- bzw. von Faktor Xa-Inhibitoren ist bereits für die therapeutische Anwendung zugelassen oder befindet sich in der Zulassung. Beispiele dafür sind die Substanzen Dabigatran (PRADAXA®), Argatroban (ARGATROBAN®), Rivaroxaban (XARELTO®), Apixaban (ELIQUIS®) und Edoxaban (LIXIANA®).

[0007] In der Labordiagnostik spielt die Qualitätssicherung, die sicherstellen soll, dass ein Analyseergebnis, das mit einem gegebenen Testsystem für eine Patientenprobe ermittelt wurde, präzise und richtig ist, eine wichtige Rolle. Ein allgemein praktiziertes Vorgehen besteht darin, dass man zwischen den Messungen von Patientenproben stichprobenartig und mit demselben Testsystem (Reagenzien, Analysegerät, etc.) sogenannte Kontrollproben misst, denen vom Hersteller Zielwerte für den zu bestimmenden Analyten zugewiesen sind. Entspricht das Ergebnis einer solchen Kontrollmessung dem Zielwert beziehungsweise liegt es innerhalb eines vorgegebenen Toleranzbereichs um den Zielwert, kann davon ausgegangen werden, dass auch die mit dem angewandten Testsystem für die Patientenproben ermittelten Ergebnisse frei sind von systematischen Fehlern und damit richtig und präzise sind.

[0008] Es sind verschiedene Tests für therapeutische Gerinnungsfaktor-Inhibitoren, insbesondere für Thrombin- und Faktor Xa-Inhibitoren auf dem Markt erhältlich. Derartige Tests umfassen die notwendigen Reagenzien zur quantitativen Messung der Inhibitoraktivität in einer Probe, also üblicherweise ein Thrombin- oder Faktor Xa-Reagenz und ein entsprechendes Peptidsubstrat-Reagenz sowie für den zu bestimmenden Inhibitor spezifische Kalibrator- und Kontrollmaterialien, wobei die Kalibrator- und Kontrollmaterialien definierte Mengen des zu bestimmenden Inhibitors enthalten. Beispielsweise umfasst ein Testsystem für den Thrombininhibitor Dabigatran ein Thrombin-Reagenz, ein für Thrombin spezifisches Peptidsubstrat-Reagenz und Kalibrator- und Kontrollmaterialien, die definierte Mengen Dabigatran enthalten. Während das Thrombin-Reagenz und das für Thrombin spezifische Peptidsubstrat-Reagenz auch in einem Test zur Bestimmung eines anderen Thrombininhibitors verwendet werden können, müssen die Kalibrator- und Kontrollmaterialien jedoch jeweils den spezifischen Inhibitor enthalten.

[0009] Problematisch ist die große und weiter zunehmende Anzahl therapeutischer Gerinnungsfaktor-Inhibitoren, für

deren Bestimmung jeweils spezifische Kalibrator- und Kontrollmaterialien zur Verfügung gestellt werden müssen. Üblicherweise wird als Kontroll- bzw. Kalibratormaterial normales Humanplasma verwendet, dem eine definierte Menge des jeweiligen Inhibitors hinzugefügt ist. Die Herstellung spezifischer Kalibrator- und Kontrollmaterialien für jeden einzelnen therapeutischen Inhibitor bedeutet für die Hersteller der Teste einen hohen Entwicklungsaufwand.

5 **[0010]** Auch für den Anwender ist die Vielzahl der benötigten Kontroll- und Kalibratormaterialien problematisch, da er die vielen verschiedenen Kontroll- und Kalibratormaterialien anschaffen, vorrätig halten und handhaben muss. Insbesondere bei der Verwendung von automatischen Analysegeräten, die nur eine beschränkte Kapazität für die Aufnahme verschiedener Kontroll- und Kalibratormaterialien aufweisen, ist es praktisch nicht möglich, die für alle therapeutisch angewendeten Thrombin- und Faktor Xa-Inhibitoren spezifischen Kontroll- und Kalibratormaterialien im Gerät parallel zu platzieren. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Haltbarkeit von Plasmakontrollen und -kalibratoren beschränkt ist, sodass Kontrollen und Kalibratoren für Teste, die weniger häufig durchgeführt werden, nicht vollständig aufgebraucht werden können, bevor sie wegen Ablaufs der maximalen Haltbarkeit unverbraucht entsorgt werden müssen.

10 **[0011]** Es ist daher wünschenswert, die Anzahl der notwendigen Kontroll- und Kalibratormaterialien zu reduzieren, um die vorgenannten Nachteile zu beseitigen und um die automatische Abarbeitung der verschiedenen spezifischen Teste auf einem Analysegerät sicherzustellen.

15 **[0012]** Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, die geschilderten Probleme im Zusammenhang mit der Vielzahl der erforderlichen Plasmakontrollen und -kalibratoren zu beheben.

20 **[0013]** In der EP-A1-2843416 werden Kontroll- und Kalibratorplasmen beschrieben, die zur Verwendung in einem ersten Test zur Bestimmung eines ersten spezifischen Thrombininhibitors und zur Verwendung in einem zweiten Test zur Bestimmung eines ersten spezifischen Faktor Xa-Inhibitors vorgesehen sind und die den jeweiligen ersten spezifischen Thrombininhibitor und den jeweiligen ersten spezifischen Faktor Xa-Inhibitor enthalten, z.B. Dabigatran und Rivaroxaban. Auf diese Weise kann die Anzahl der notwendigen Kalibrator- und Kontrollmaterialien um 50 % verringert werden.

25 **[0014]** Die vorliegende Erfindung löst die oben geschilderten Probleme durch die Bereitstellung eines Kontrollmaterials, das anstelle eines oder mehrerer therapeutischer Inhibitoren eine definierte Menge mindestens eines unspezifischen Serinproteaseinhibitors in einer wässrigen Pufferlösung enthält und dem mindestens ein Zielwert für die Konzentration mindestens eines therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zugewiesen ist. Dies hat den Vorteil, dass für alle Teste zur quantitativen Bestimmung von therapeutischen Inhibitoren von Gerinnungsfaktoren aus der Gruppe der Serinproteasen ein einziges (universales) Kontrollmaterial verwendet werden kann.

30 **[0015]** Unter dem Begriff "Gerinnungsfaktor" ist jede plasmatische Serinprotease zu verstehen, die eine prokoagulatorische (gerinnungsfördernde) Funktion im Blutgerinnungssystem eines Säugetiers, bevorzugt des Menschen, hat. Prokoagulatorische Gerinnungsfaktoren sind in der aktivierten Form beispielsweise Faktor IIa (Thrombin), Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor Xa, Faktor XIa und Faktor XIIa. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist, sofern nichts anderes erwähnt ist, mit einem "Gerinnungsfaktor" dessen aktive Form und nicht dessen inaktive Vorläuferform gemeint.

35 **[0016]** Die Haupttargets einer Antikoagulationsstherapie sind derzeit die Gerinnungsfaktoren Thrombin und Faktor Xa. Deshalb werden diese beiden Gerinnungsfaktoren und ihre Inhibitoren im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung immer wieder beispielhaft erwähnt. Es ist jedoch durchaus möglich, dass in Zukunft alternative Therapieansätze entwickelt werden, die auf der Hemmung anderer prokoagulatorischer Gerinnungsfaktoren, wie beispielsweise Faktor VIIa, Faktor IXa, Faktor XIa oder Faktor XIIa, beruhen. Auch in diesen Fällen ist das erfindungsgemäße Vorgehen anwendbar.

40 **[0017]** Der Begriff "therapeutischer Inhibitor eines Gerinnungsfaktors" bezeichnet eine therapeutisch wirksame Substanz, die natürlicherweise nicht im menschlichen Körper vorkommt und die die proteolytische Aktivität eines Gerinnungsfaktors entweder durch direkte Bindung an den Gerinnungsfaktor oder durch die Interaktion mit physiologischen Kofaktoren, wie z.B. Antithrombin oder Heparin Cofaktor II, indirekt reduziert. Der Begriff "therapeutischer Inhibitor" umfasst explizit nicht gerinnungshemmende Proteine oder Proteinkomplexe, die natürlicherweise im menschlichen Körper vorkommen, wie z.B. Antithrombin oder Heparin Cofaktor II.

45 **[0018]** Therapeutische Inhibitoren inhibieren typischerweise einen spezifischen Gerinnungsfaktor, im Allgemeinen entweder Thrombin oder Faktor Xa. Einen Sonderfall stellen die Heparine dar, da sie in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts Thrombin und Faktor Xa in unterschiedlichem Ausmaß hemmen. Die gerinnungshemmende Wirkung aller Heparine beruht auf ihrer Komplexbildung mit Antithrombin, dem wichtigsten natürlicherweise im Körper vorkommenden, plasmatischen Inhibitor aktivierter Gerinnungsfaktoren. Antithrombin hemmt die Gerinnungsfaktoren Thrombin und Faktor Xa sowie in geringem Ausmaß auch die anderen Serinproteasen FIXa, FXIa, FXIIa, Kallikrein und Plasmin. Durch die Bindung von Heparin an Antithrombin kommt es zu einer Konformationsänderung des Antithrombins, welche die inhibitorische Wirkung des Antithrombins um ein Vielfaches verstärkt. Unfraktionierte Heparine (UFH) und fraktionierte Heparine (LMWH), Heparinderivate, Heparinoide bzw. Pentasaccharide unterscheiden sich in ihrer Spezifität für Thrombin und Faktor Xa. Während UFH Thrombin und FXa gleichermaßen hemmen, weisen LMWH überwiegend eine FXa-hemmende Wirkung und nur in geringerem Maße eine Thrombin-hemmende Wirkung auf. Pentasaccharide wie Fondaparinux hemmen selektiv FXa und zeigen gar keine Thrombinhemmung.

[0019] Therapeutische Gerinnungsfaktorinhibitoren aus der Gruppe der spezifischen Thrombininhibitoren sind beispielsweise Hirudin, Orgaran, Argatroban, Dabigatran, Melagatran, Ximelagatran, Bivalirudin, Lepirudin, MCC-977, SSR-182289, TGN-255, TGN-167, ARC-183 und Odiparcil.

[0020] Therapeutische Gerinnungsfaktorinhibitoren aus der Gruppe der spezifischen Faktor Xa-Inhibitoren sind beispielsweise Apixaban, Rivaroxaban, Edoxaban, Fondaparinux, Otamixaban, LY 517717, YM 153, DU-176b, DX-9065a und KFA-1982.

[0021] Unter dem Begriff "unspezifischer Serinproteaseinhibitor" ist ein Inhibitor zu verstehen, der eine Vielzahl (mindestens zwei) von Gerinnungsfaktoren aus der Gruppe der Serinproteasen zu binden vermag und der durch diese Bindung die proteolytische Aktivität mehrerer Gerinnungsfaktoren reduziert. Typischerweise inhibieren diese unspezifischen Serinproteaseinhibitoren nicht nur Gerinnungsfaktoren aus der Gruppe der Serinproteasen, sondern weitere Vertreter dieser Unterfamilie der Peptidasen. In Bezug auf die vorliegende Erfindung ist jeder Serinproteaseinhibitor geeignet, der mindestens die Gerinnungsfaktoren zu inhibieren vermag, welche von den therapeutischen Inhibitoren inhibiert werden, die quantitativ bestimmt werden sollen. Bekannte unspezifische Serinproteaseinhibitoren, die eine Vielzahl von Serinproteasen, darunter auch Thrombin und Faktor Xa zu inhibieren vermögen sind z.B. Benzamidin, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), und 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF, auch bekannt unter dem Handelsnamen Pefabloc SC®).

[0022] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist also ein Verfahren zur Herstellung eines Kontrollmaterials, das frei ist von therapeutischen Inhibitoren von Gerinnungsfaktoren aus der Gruppe der Serinproteasen und das zur Verwendung in einem Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit von Verfahren zur quantitativen Bestimmung von therapeutischen Inhibitoren von Gerinnungsfaktoren aus der Gruppe der Serinproteasen geeignet ist, das Verfahren zur Herstellung des Kontrollmaterials umfassend die Schritte:

(a) Lösen einer definierten Menge mindestens eines unspezifischen Serinproteaseinhibitors in einer wässrigen Pufferlösung, und

(b) Zuweisen eines ersten Zielwertes für die Konzentration eines ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors,

wobei das Zuweisen des ersten Zielwertes für die Konzentration des ersten therapeutischen

[0023] Gerinnungsfaktorinhibitors wie folgt durchgeführt wird:

i) Vermischen einer ersten Teilmenge der in Schritt a) hergestellten Lösung mit einer definierten Menge eines ersten Gerinnungsfaktors und mit einem Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu einem ersten Reaktionsansatz,

ii) Messen der Menge eines Spaltprodukts des Substrats in dem ersten Reaktionsansatz,

iii) Vergleichen der in dem ersten Reaktionsansatz gemessenen Menge des Spaltprodukts mit vorbestimmten Kalibrationswerten, die die in dem ersten Reaktionsansatz gemessene Menge des Spaltprodukts einer bekannten Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zuordnen, und Ermitteln der zu der gemessenen Menge des Spaltprodukts dazugehörigen Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors, und

iv) Festlegen der so ermittelten Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors als ersten Zielwert des Kontrollmaterials.

[0024] Ein erfindungsgemäßes Kontrollmaterial ist immer frei von therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitoren. Es ist weiterhin vorzugsweise frei von Plasma, enthält also kein humanes und/oder tierisches Plasma. Vorzugsweise besteht ein erfindungsgemäßes Kontrollmaterial aus einer wässrigen Pufferlösung und dem darin gelösten unspezifischen Serinproteaseinhibitor. Anstelle eines unspezifischen Serinproteaseinhibitors kann auch eine Kombination von zwei oder mehr unspezifischen Serinproteaseinhibitoren in dem Kontrollmaterial enthalten sein. Geeignete wässrige Pufferlösungen sind beispielsweise phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung (z.B. 0,05 M Natriumdihydrogenphosphat, 0,9 % NaCl, pH-Wert 6,9 bis 7,3), imidazolgepufferte isotonische Kochsalzlösung (z.B. 0,1 M Imidazol, 0,9 % NaCl, pH-Wert 6,9 bis 7,3), glycinegepufferte isotonische Kochsalzlösung (z.B. 0,1 M Glycin, 0,9 % NaCl, pH-Wert 8,0 bis 8,2), trisgepufferte isotonische Kochsalzlösung (z.B. 0,1 M TRIS, 0,9 % NaCl, pH-Wert 6,9 bis 7,3) oder HEPES-Pufferlösung (z.B. 50 mM HEPES, pH-Wert 6,9 bis 7,4).

[0025] Gegebenenfalls kann ein Kontrollmaterial zusätzlich Antioxidanzien, Konservierungsmittel und/oder bovines Serumalbumin (BSA) enthalten.

[0026] Vorzugsweise enthält ein erfindungsgemäßes Kontrollmaterial nach dem Lösen eines unspezifischen Serin-

proteaseinhibitoren in der Puffermatrix Benzamidin in einer Konzentration von 0.1 mM - 500 mM oder Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in einer Konzentration von 0.1 mM - 500 mM oder 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF) in einer Konzentration von 0.1 mM - 500 mM.

[0027] Im Zusammenhang mit der Herstellung eines erfindungsgemäßen Kontrollmaterials wird der durch Lösen einer definierten Menge des unspezifischen Serinproteaseinhibitors in einer wässrigen Pufferlösung bereitgestellten Lösung (die Kontrolllösung) mindestens ein erster Zielwert für die Konzentration eines ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zugewiesen.

[0028] Dazu wird die Kontrolllösung mit einem solchen Testsystem analysiert wie eine später zu analysierende Patientenprobe, d.h. eine Teilmenge der Kontrolllösung wird mit entsprechenden Reagenzien vermischt, die einen ersten Gerinnungsfaktor und ein Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor enthalten, und es wird die Menge eines Spaltprodukts in dem so erhaltenen Reaktionsansatz gemessen. Die gemessene Menge des Spaltprodukts wird dann mit vorbestimmten Kalibrationswerten verglichen.

[0029] Die Kalibrationswerte werden in herkömmlicher Weise vorab bestimmt, d.h. es werden mindestens zwei Kalibratormaterialien, üblicherweise humanes Normalplasma, die definierte Mengen des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors enthalten, in dem zu kalibrierenden Testsystem analysiert, die erhaltenen Messwerte werden den bekannten Konzentrationen des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zugeordnet, und es wird eine Kalibrationskurve erstellt, an der anhand der Messwerte unbekannter Proben deren Konzentration abgelesen werden kann.

[0030] Die sich anhand eines solchen Vergleichs ergebende Konzentration des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors der Kontrolllösung wird dieser dann als Zielwert zugewiesen.

[0031] Unter dem Begriff "Zielwert" ist eine Konzentrationsangabe für einen therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitor zu verstehen (z.B. U/mL, mg/mL etc.), die -wenn dieser therapeutische Gerinnungsfaktorinhibitor in diesem Kontrollmaterial in einem kalibrierten Testsystem quantitativ bestimmt wird- wiedergefunden werden soll. Der Begriff "Zielwert" umfasst explizit auch einen Zielwertbereich, der geringfügige, tolerable Abweichungen oberhalb und/oder unterhalb eines einzelnen Wertes umfasst.

[0032] Das Besondere an der vorliegenden Erfindung ist, dass einem erfindungsgemäß hergestellten Kontrollmaterial auch eine Vielzahl von Zielwerten (zwei, drei, vier, fünf, sechs oder mehr) für eine Vielzahl verschiedener therapeutischer Gerinnungsfaktorinhibitoren (zwei, drei, vier fünf, sechs oder mehr) zugewiesen werden kann.

[0033] Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung eines Kontrollmaterials umfasst daher zusätzlich folgende Schritte:

(c) Zuweisen eines zweiten Zielwertes für die Konzentration eines zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors,

wobei das Zuweisen des zweiten Zielwertes für die Konzentration des zweiten therapeutischen

[0034] Gerinnungsfaktorinhibitors wie folgt durchgeführt wird:

i) Vermischen einer zweiten Teilmenge der in Schritt a) hergestellten Lösung mit einer definierten Menge eines zweiten Gerinnungsfaktors und mit einem Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu einem zweiten Reaktionsansatz,

ii) Messen der Menge eines Spaltprodukts des Substrats in dem zweiten Reaktionsansatz,

iii) Vergleichen der in dem zweiten Reaktionsansatz gemessenen Menge des Spaltprodukts mit vorbestimmten Kalibrationswerten, die die in dem zweiten Reaktionsansatz gemessene Menge des Spaltprodukts einer bekannten Konzentration des zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zuordnen, und Ermitteln der zu der gemessenen Menge des Spaltprodukts dazugehörigen Konzentration des zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors, und

iv) Festlegen der so ermittelten Konzentration des zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors als zweiten Zielwert des Kontrollmaterials.

[0035] Das Zuweisen weiterer Zielwerte für die Konzentrationen weiterer (dritter, vierter, fünfter, sechster etc.) therapeutischer Gerinnungsfaktorinhibitoren kann in analoger Weise erfolgen.

[0036] Auf diese Weise ist ein universales Kontrollmaterial für eine Vielzahl von Gerinnungsfaktorinhibitor-Testen (zwei, drei, vier fünf, sechs oder mehr) erhältlich.

[0037] Besonders bevorzugt ist die Herstellung eines Kontrollmaterials, das zur Verwendung in einem Verfahren zur Kontrolle von einem ersten Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines ersten Thrombininhibitors und von einem zweiten Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines ersten Faktor Xa-Inhibitors und ggf. von weiterer Verfahren zur quantitativen Bestimmung weiterer Gerinnungsfaktorinhibitoren geeignet ist. Dazu werden dem Kontrollmaterial, wie oben beschrieben, ein erster Zielwert für die Konzentration des ersten Thrombininhibitors, z.B. Dabigatran, und ein zweiter Zielwert für die Konzentration des ersten Faktor Xa-Inhibitors, z.B. Rivaroxaban, und ggf. weitere Zielwerte

zugewiesen.

[0038] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäß hergestellten Kontrollmaterials in einem Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung eines ersten therapeutischen Inhibitors eines Gerinnungsfaktors aus der Gruppe der Serinproteasen in einer Probe.

[0039] Eine bevorzugte Verwendung eines erfindungsgemäß hergestellten Kontrollmaterials bezieht sich auf die Verwendung in einem ersten Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des ersten therapeutischen Inhibitors eines Gerinnungsfaktors aus der Gruppe der Serinproteasen in einer Probe und/oder in einem zweiten Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des zweiten therapeutischen Inhibitors eines Gerinnungsfaktors aus der Gruppe der Serinproteasen in einer Probe. Dies setzt voraus, dass dem Kontrollmaterial sowohl ein erster Zielwert für die Konzentration eines ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors und ein zweiter Zielwert für die Konzentration eines zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zugewiesen sind. Wie bereits oben erläutert, kann ein erfindungsgemäß hergestelltes Kontrollmaterial, dem noch weitere Zielwerte für die Konzentrationen weiterer (dritter, vierter, fünfter, sechster etc.) therapeutischer Gerinnungsfaktorinhibitoren zugewiesen sind, auch in weiteren Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit von Verfahren zur quantitativen Bestimmung der weiteren therapeutischen Inhibitoren (dritter, vierter, fünfter, sechster etc.) von Gerinnungsfaktoren aus der Gruppe der Serinproteasen in einer Probe verwendet werden.

[0040] Ein Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung eines therapeutischen Inhibitors eines Gerinnungsfaktors aus der Gruppe der Serinproteasen umfasst die Analyse des Kontrollmaterials in demselben Testsystem (hinsichtlich der Analysemethode und Messsystem), mit dem auch Patientenproben analysiert werden.

[0041] Bei der Kontrolle der Richtigkeit eines analytischen Verfahrens handelt es sich um ein Verfahren zur Qualitätssicherung, das sicherstellen soll, dass die Ergebnisse eines in einem Labor angewandten analytischen Verfahrens zuverlässig sind und nicht etwa aufgrund eines systematischen Fehlers zu Fehlbeurteilungen führen könnten.

[0042] Dazu wird geprüft, ob das mit einer Kontrollprobe ermittelte Analyseergebnis dem der Kontrollprobe zugewiesenen Zielwert (oder Zielwertebereich) entspricht. Stellt sich heraus, dass das mit einer Kontrollprobe ermittelte Analyseergebnis dem Zielwert der Kontrollprobe entspricht, wird festgestellt, dass das analytische Verfahren zuverlässig funktioniert und richtige Ergebnisse liefert. Stellt sich heraus, dass das mit einer Kontrollprobe ermittelte Analyseergebnis dem Zielwert der Kontrollprobe nicht entspricht, wird festgestellt, dass das analytische Verfahren nicht zuverlässig funktioniert und dass die Ergebnisse dieses analytischen Verfahrens wegen des Risikos von Fehlbeurteilungen nicht zur Beurteilung von Patientenproben verwendet werden sollten.

[0043] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist also ein Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung eines therapeutischen Inhibitors eines ersten Gerinnungsfaktors aus der Gruppe der Serinproteasen in einer Patientenprobe. Das Verfahren zur quantitativen Bestimmung des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors umfasst folgende Schritte:

- a. Vermischen der Patientenprobe mit einer definierten Menge des ersten Gerinnungsfaktors und mit einem Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu einem Reaktionsansatz,
- b. Messen der Menge eines Spaltprodukts des Substrates in dem Reaktionsansatz,
- c. Vermischen von mindestens zwei Kalibratorproben, die jeweils eine definierte Menge des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors enthalten, mit derselben definierten Menge des ersten Gerinnungsfaktors und mit demselben Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu jeweils einem Kalibratorreaktionsansatz,
- d. Messen der Menge desselben Spaltprodukts des Substrates in den Kalibratorreaktionsansätzen und Erstellen von Kalibrationswerten, die die in den Kalibratorreaktionsansätzen gemessene Menge des Spaltprodukts einer bekannten Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zuordnen, und Ermitteln der zu der gemessenen Menge des Spaltprodukts dazugehörigen Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors in der Patientenprobe, und
- e. Bestimmen der Menge des in der Patientenprobe enthaltenen therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors durch Vergleichen der in dem Reaktionsansatz gemessenen Menge des Spaltprodukts mit den Kalibrationswerten.

[0044] Zur Kontrolle der Richtigkeit des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors werden zusätzliche folgende Schritte durchgeführt:

- i) Vermischen einer Kontrollprobe bestehend aus einer Teilmenge eines erfindungsgemäß hergestellten Kontrollmaterials mit derselben definierten Menge des ersten Gerinnungsfaktors und mit demselben Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu einem Kontrollreaktionsansatz,
- ii) Messen der Menge desselben Spaltprodukts des Substrates in dem Kontrollreaktionsansatz,
- iii) Vergleichen der in dem Kontrollreaktionsansatz gemessenen Menge des Spaltprodukts mit den Kalibrationswerten und Ermitteln der Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors in der Kontrollprobe, und

A. Feststellen, dass die Richtigkeit des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors in der Patientenprobe gegeben ist, wenn die in Schritt iii) in der Kontrollprobe ermittelte Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors dem ersten Zielwert für die Konzentration eines ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors der Kontrollprobe entspricht oder

B. Feststellen, dass die Richtigkeit des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors nicht gegeben ist, wenn die in Schritt iii) in der Kontrollprobe ermittelte Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors von dem ersten Zielwert für die Konzentration eines ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors der Kontrollprobe abweicht.

[0045] Wenn im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Rede ist von einem Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors umfassend die Schritte:

a. Vermischen einer Probe mit einer definierten Menge eines Gerinnungsfaktors und mit einem Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu einem Reaktionsansatz, und

b. Messen der Menge eines Spaltprodukts des Substrates in dem Reaktionsansatz,

handelt es sich im Wesentlichen um aus dem Stand der Technik bekannte Gerinnungsfaktoraktivitätsteste, die die Messung der Hemmung der Gerinnungsfaktoraktivität ermöglichen.

[0046] Unter einer "Probe" ist im Sinne der Erfindung das Material zu verstehen, das den zu bestimmenden direkten Gerinnungsinhibitor vermutlich enthält. Der Begriff Probe umfasst insbesondere menschliche oder tierische Körperflüssigkeiten, vornehmlich Blut, Plasma, Serum und Urin. Sofern die Probe von einem einzigen Individuum stammt wird sie auch als Patientenprobe bezeichnet.

[0047] Die Probe kann beispielsweise einem konventionellen Gerinnungsfaktoraktivitätstest unterworfen werden, wobei der Probe eine definierte Menge desjenigen aktivierten Gerinnungsfaktors zugegeben wird, für welchen der zu bestimmende direkte Gerinnungsinhibitor spezifisch ist. Bei einem Verfahren zur Bestimmung eines Thrombininhibitors wird konsequenterweise eine definierte Menge Thrombin zugegeben; bei einem Verfahren zur Bestimmung eines Faktor Xa-Inhibitors wird eine definierte Menge Faktor Xa zugegeben, und die Inhibitor-abhängige Inaktivierung der Aktivität des zugegebenen Gerinnungsfaktors wird gemessen. Grundsätzlich können rekombinante, gentechnisch hergestellte oder aus natürlichem oder in vitro-kultiviertem Rohmaterial isolierte Gerinnungsfaktoren verwendet werden. Rohmaterialien für die Gewinnung eines Gerinnungsfaktors können z.B. tierische, beispielsweise bovine, oder humane Gewebe oder Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Plasma, Lympheflüssigkeit) sein, Überstände oder Lysate tierischer oder humaner Zellkulturen oder Kulturen eukaryontischer Zellen oder von Mikroorganismen, wie Bakterien oder Pilzen, die einen rekombinanten Gerinnungsfaktor exprimieren. Die notwendigen Schritte zur Aktivierung inaktiver Gerinnungsfaktoren sind dem Fachmann hinlänglich bekannt.

[0048] Bevorzugterweise wird die Inhibitor-abhängige Inaktivierung der amidolytischen Aktivität des zugegebenen Gerinnungsfaktors mit Hilfe eines chromogenen, fluorogenen, amperogenen oder anderweitig markierten Substrats ermittelt, das spezifisch von dem aktivierten Gerinnungsfaktor gespalten wird. Unter einem "Substrat mit Spezifität für einen Gerinnungsfaktor" ist ein Substrat zu verstehen, das hinreichend spezifisch von einem proteolytischen Gerinnungsfaktor umgesetzt wird, wobei bei der spezifischen Substratumsetzung ein nachweisbares Spaltprodukt freigesetzt wird. Insbesondere spaltbare Substrate, welche mindestens eine Spaltstelle für einen aktivierten Gerinnungsfaktor aufweisen, sind dem Fachmann hinlänglich bekannt. Ein spaltbares Substrat kann ein synthetisch, rekombinant oder biotechnologisch hergestelltes Molekül oder ein natürliches Molekül sein, das durch Einwirken des aktivierten proteolytischen Gerinnungsfaktors in zwei Spaltprodukte zerlegt wird. Ein spaltbares Substrat kann ganz oder teilweise aus einem Peptid bestehen. Bevorzugterweise umfasst es zumindest im Bereich der Spaltstelle einen Peptidanteil.

[0049] Bei der abspaltbaren Signalgruppe ("Label") eines Substrats kann es sich z.B. um einen im sichtbaren Bereich des Spektrums bestimmenden Farbstoff, einen Fluoreszenzfarbstoff oder einen im UV-Bereich bestimmenden Farbstoff handeln. Beispielsweise werden Peptide verwendet, die an der Carboxygruppe eines Argininrests einen durch Amidbindung gebundenen Farbstoffrest aufweisen. Besonders geeignet sind hierfür p-Nitroanilidgruppen (pNA) und 5-Amino-2-Nitro-Benzoessäurederivate (ANBA), sowie von diesen durch Substitution abgeleitete Farbstoffe, welche nach Abspaltung vom Peptidanteil durch eine photometrische Messung bei 405 nm Wellenlänge quantifiziert werden können. Bevorzugterweise besteht der Peptidanteil eines spaltbaren Substrats aus 3 bis etwa 150 Aminosäureresten. In den Patentdokumenten EP-A1-0034122 und US 4,508,644 sind eine Vielzahl von geeigneten chromogenen Peptidsubstraten, deren Herstellung und deren Verwendung in gerinnungsdiagnostischen Tests beschrieben, z.B. zur Bestimmung der Gerinnungsfaktoren Thrombin und Xa.

[0050] Die Menge des freigesetzten signalbildenden Spaltprodukts, z.B. der chromogenen, fluorogenen oder amperogenen Gruppe, verhält sich umgekehrt proportional zur Inhibitoraktivität bzw. -konzentration in der Probe. Mit Hilfe einer Kalibrationskurve, erstellt aus der Messung von Kalibratorlösungen mit bekannten Aktivitäten eines therapeutischen Inhibitors, lässt sich die Menge des Inhibitors in einer Patientenprobe korrekt quantifizieren.

[0051] Die amidolytische Aktivität kann kinetisch oder als Endpunktbestimmung ausgewertet werden. Bei der kinetischen Methode wird die Reaktion, d.h. die verbliebene Gerinnungsfaktoraktivität als Maß für die vorhandene Inhibitoraktivität, anhand der Umsatzrate des spaltbaren Substrats quantifiziert. Bei der Endpunktbestimmung wird nach einer vorbestimmten Messzeit die Spaltreaktion gestoppt und die Menge des freigesetzten Spaltprodukts gemessen.

[0052] Die folgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung und sind nicht als Einschränkung zu verstehen.

BEISPIELE

BEISPIEL 1: Herstellung universaler Kontrollmaterialien für die Bestimmung eines Thrombin- und eines Thrombin-/Faktor Xa-Inhibitors

[0053] Es sollten universale Kontrollmaterialien bereitgestellt werden, die gleichermaßen zur Qualitätskontrolle eines Tests zur quantitativen Bestimmung von Dabigatran (therapeutischer Thrombininhibitor) und eines Tests zur quantitativen Bestimmung von Heparin verwendbar sind. Heparin ist ein therapeutischer Thrombin- und FXa-Inhibitor, dessen Konzentration typischerweise über die Hemmung von Faktor Xa bestimmt wird.

[0054] Bei dem Test zur quantitativen Bestimmung von Dabigatran wird in einem automatischen Analysegerät die Probe mit einem Reagenz I enthaltend eine definierte Thrombinmenge und mit einem Reagenz II enthaltend eine definierte Menge eines durch Thrombin hydrolysierbaren Substrates (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-Isopropylamid) vermischt, und es wird die Geschwindigkeit des Anstiegs der Absorption des Reaktionsansatzes bei 405 nm gemessen, welche ein Maß für die Substratspaltung durch Thrombin darstellt. Die absoluten Messwerte werden mit einer zuvor in demselben Messsystem (Reagenzien und Analysegerät) bestimmten Kalibrationskurve verglichen und so die Dabigatran-Konzentration (ng/mL) bestimmt. Die Kalibrationskurve war zuvor mit Kalibratorplasmen mit bekannter Dabigatran-Konzentration erstellt worden.

[0055] Bei dem Test zur quantitativen Bestimmung von Heparin wird in einem automatischen Analysegerät die Probe mit einem Reagenz I enthaltend eine definierte Faktor Xa-Menge und mit einem Reagenz II enthaltend eine definierte Menge eines durch Faktor Xa hydrolysierbaren Substrates (Suc-Ile-Glu(piperidin-1-yl)-Gly-Arg-pNA) vermischt, und es wird die Geschwindigkeit des Anstiegs der Absorption des Reaktionsansatzes bei 405 nm gemessen, welche ein Maß für die Substratspaltung durch Faktor Xa darstellt. Die absoluten Messwerte werden mit einer zuvor in demselben Messsystem (Reagenzien und Analysegerät) bestimmten Kalibrationskurve verglichen und so die Heparin-Konzentration (IU/mL) bestimmt. Die Kalibrationskurve war zuvor mit Kalibratorplasmen mit bekannter Heparin-Konzentration erstellt worden.

[0056] Durch Lösen des unspezifischen Serinproteaseinhibitors Benzamidin in HEPES/BSA-Puffer-Lösung (0,05 M HEPES, 10 g/L BSA, pH-Wert 7,4) wurden Kontrolllösungen mit unterschiedlicher Benzamidinkonzentration im Bereich zwischen 3 mM und 100 mM) hergestellt.

[0057] Einzelnen Kontrolllösungen wurden jeweils Zielwerte für die Konzentration von Dabigatran und Heparin zugewiesen, indem jeweils mehrfach ein Aliquot jeder Kontrolllösung als Probe in den oben beschriebenen Dabigatran- und Heparin-Testen analysiert wurde und die Messergebnisse mit zuvor mit Kalibratorplasmen mit bekannter Dabigatran- bzw. Heparin-Konzentration erstellten Kalibrationskurven verglichen wurden.

[0058] Die so ermittelte Dabigatran- bzw. Heparin-Konzentration, die dann der jeweiligen Kontrolllösung als Zielwerte zugeordnet wurden und die davon abgeleiteten Zielwertbereiche (in Klammern) für die ausgewählten Kontrolllösungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Zielwerte ausgewählter erfindungsgemäßer Kontrolllösungen

	Benzamidin 15 mM	Benzamidin 10 mM
Dabigatran (ng/mL)	37 (30 - 44)	25 (20 - 30)
Heparin (IU/mL)	1.33 (1.06 - 1.60)	0.90 (0.72 - 1.08)

[0059] Wird in einem Messsystem in den Kontrolllösungen eine Dabigatran- bzw. Heparin-Konzentration bestimmt, die dem deklarierten Zielwert entspricht bzw. innerhalb des Zielwertbereiches liegt, zeigt dies die Richtigkeit des in dem Messsystem durchgeführten Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors an. Wird hingegen in den Kontrolllösungen eine Dabigatran- bzw. Heparin-Konzentration bestimmt, die von dem deklarierten Zielwert abweicht bzw. außerhalb des Zielwertbereiches liegt, zeigt dies an, dass die Richtigkeit des in dem Messsystem durchgeführten Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors nicht gegeben ist. Im letzteren Fall sollten Ergebnisse, die für Patientenproben ermittelt wurden, nicht für diagnostische

Zwecke verwendet werden.

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Herstellung eines Kontrollmaterials, das frei ist von therapeutischen Inhibitoren von Gerinnungsfaktoren aus der Gruppe der Serinproteasen und das zur Verwendung in einem Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit von Verfahren zur quantitativen Bestimmung von therapeutischen Inhibitoren von Gerinnungsfaktoren aus der Gruppe der Serinproteasen geeignet ist, das Verfahren zur Herstellung des Kontrollmaterials umfassend die Schritte:

10

- (a) Lösen einer definierten Menge mindestens eines unspezifischen Serinproteaseinhibitors in einer wässrigen Pufferlösung, und
- (b) Zuweisen eines ersten Zielwertes für die Konzentration eines ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors,

15

wobei das Zuweisen des ersten Zielwertes für die Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors wie folgt durchgeführt wird:

20

- i) Vermischen einer ersten Teilmenge der in Schritt a) hergestellten Lösung mit einer definierten Menge eines ersten Gerinnungsfaktors und mit einem Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu einem ersten Reaktionsansatz,
- ii) Messen der Menge eines Spaltprodukts des Substrats in dem ersten Reaktionsansatz,
- iii) Vergleichen der in dem ersten Reaktionsansatz gemessenen Menge des Spaltprodukts mit vorbestimmten Kalibrationswerten, die die in dem ersten Reaktionsansatz gemessene Menge des Spaltprodukts einer bekannten Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zuordnen, und Ermitteln der zu der gemessenen Menge des Spaltprodukts dazugehörigen Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors, und
- iv) Festlegen der so ermittelten Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors als ersten Zielwert des Kontrollmaterials.

25

30

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Verfahren zur Herstellung des Kontrollmaterials ferner folgende Schritte umfasst:

35

- (c) Zuweisen eines zweiten Zielwertes für die Konzentration eines zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors,

wobei das Zuweisen des zweiten Zielwertes für die Konzentration des zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors wie folgt durchgeführt wird:

40

- i) Vermischen einer zweiten Teilmenge der in Schritt a) hergestellten Lösung mit einer definierten Menge eines zweiten Gerinnungsfaktors und mit einem Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu einem zweiten Reaktionsansatz,
- ii) Messen der Menge eines Spaltprodukts des Substrats in dem zweiten Reaktionsansatz,
- iii) Vergleichen der in dem zweiten Reaktionsansatz gemessenen Menge des Spaltprodukts mit vorbestimmten Kalibrationswerten, die die in dem zweiten Reaktionsansatz gemessene Menge des Spaltprodukts einer bekannten Konzentration des zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zuordnen, und Ermitteln der zu der gemessenen Menge des Spaltprodukts dazugehörigen Konzentration des zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors, und
- iv) Festlegen der so ermittelten Konzentration des zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors als zweiten Zielwert des Kontrollmaterials.

45

50

3. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der unspezifische Serinproteaseinhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe Benzamidin, Phenylmethylsulfonylfluorid und 4-(2-Aminoethyl)benzonsulfonylfluorid.

55

4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der erste therapeutische Gerinnungsfaktorinhibitor und der zweite therapeutische Gerinnungsfaktorinhibitor ausgewählt sind aus der Gruppe Thrombininhibitor und Faktor Xa-Inhibitor.

EP 3 348 649 A1

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei der Thrombininhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe unfraktioniertes Heparin, niedermolekulares Heparin, Hirudin, Orgaran, Argatroban, Dabigatran, Melagatran, Ximelagatran, Bivalirudin, Lepirudin, MCC-977, SSR-182289, TGN-255, TGN-167, ARC-183 und Odiparcil.
- 5 6. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei der FXa-Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe unfraktioniertes Heparin, niedermolekulares Heparin, Apixaban, Rivaroxaban, Edoxaban, Fondaparinux, Otamixaban, LY 517717, YM 153, DU-176b, DX-9065a und KFA-1982.
- 10 7. Verwendung eines Kontrollmaterials herstellbar gemäß einem der Ansprüche 1-6, in einem Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung eines ersten therapeutischen Inhibitors eines Gerinnungsfaktors aus der Gruppe der Serinproteasen in einer Probe.
8. Verwendung eines Kontrollmaterials,
- 15
 - das frei ist von therapeutischen Inhibitoren von Gerinnungsfaktoren aus der Gruppe der Serinproteasen,
 - das eine definierte Menge eines unspezifischen Serinproteaseinhibitors enthält und
 - dem mindestens ein erster Zielwert für die Konzentration eines ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zugewiesen ist,
- 20 in einem Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des ersten therapeutischen Inhibitors eines Gerinnungsfaktors aus der Gruppe der Serinproteasen in einer Probe.
9. Verwendung eines Kontrollmaterials,
- 25
 - das frei ist von therapeutischen Inhibitoren von Gerinnungsfaktoren aus der Gruppe der Serinproteasen,
 - das eine definierte Menge eines unspezifischen Serinproteaseinhibitors enthält und
 - dem mindestens ein erster Zielwert für die Konzentration eines ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors und ein zweiter Zielwert für die Konzentration eines zweiten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zugewiesen sind,
- 30 in einem ersten Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des ersten therapeutischen Inhibitors eines Gerinnungsfaktors aus der Gruppe der Serinproteasen in einer Probe und/oder in einem zweiten Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des zweiten therapeutischen Inhibitors eines Gerinnungsfaktors aus der Gruppe der Serinproteasen in einer Probe.
- 35 10. Verfahren zur Kontrolle der Richtigkeit eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung eines therapeutischen Inhibitors eines ersten Gerinnungsfaktors aus der Gruppe der Serinproteasen in einer Patientenprobe, wobei das Verfahren zur quantitativen Bestimmung des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors folgende Schritte umfasst:
- 40
 - a. Vermischen der Patientenprobe mit einer definierten Menge des ersten Gerinnungsfaktors und mit einem Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu einem Reaktionsansatz,
 - b. Messen der Menge eines Spaltprodukts des Substrates in dem Reaktionsansatz,
 - c. Vermischen von mindestens zwei Kalibratorproben, die jeweils eine definierte Menge des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors enthalten, mit derselben definierten Menge des ersten Gerinnungsfaktors und mit demselben Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu jeweils einem Kalibratorreaktionsansatz,
 - d. Messen der Menge desselben Spaltprodukts des Substrates in den Kalibratorreaktionsansätzen und Erstellen von Kalibrationswerten, die die in den Kalibratorreaktionsansätzen gemessene Menge des Spaltprodukts einer bekannten Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zuordnen, und Ermitteln der zu der gemessenen Menge des Spaltprodukts dazugehörigen Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors in der Patientenprobe,
 - e. Bestimmen der Menge des in der Patientenprobe enthaltenen therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors durch Vergleichen der in dem Reaktionsansatz gemessenen Menge des Spaltprodukts mit den Kalibrationswerten,
- 50
- 55 und wobei zur Kontrolle der Richtigkeit des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors zusätzliche folgende Schritte durchgeführt werden:
- i) Vermischen einer Kontrollprobe bestehend aus einer Teilmenge eines Kontrollmaterials gemäß Anspruch 1

EP 3 348 649 A1

mit derselben definierten Menge des ersten Gerinnungsfaktors und mit demselben Substrat mit Spezifität für diesen Gerinnungsfaktor zu einem Kontrollreaktionsansatz,

ii) Messen der Menge desselben Spaltprodukts des Substrates in dem Kontrollreaktionsansatz,

iii) Vergleichen der in dem Kontrollreaktionsansatz gemessenen Menge des Spaltprodukts mit den Kalibrationswerten und Ermitteln der Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors in der Kontrollprobe, und

A. Feststellen, dass die Richtigkeit des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors in der Patientenprobe gegeben ist, wenn die in Schritt iii) in der Kontrollprobe ermittelte Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors dem ersten Zielwert für die Konzentration eines ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors der Kontrollprobe entspricht oder

B. Feststellen, dass die Richtigkeit des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors nicht gegeben ist, wenn die in Schritt iii) in der Kontrollprobe ermittelte Konzentration des ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors von dem ersten Zielwert für die Konzentration eines ersten therapeutischen Gerinnungsfaktorinhibitors der Kontrollprobe abweicht.



EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 17 15 1547

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X	WO 2014/207107 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; ACKERMANN FRIEDRI) 31. Dezember 2014 (2014-12-31)	1,2,4-10	INV. C12Q1/56 G01N33/86
A	* Seite 20, Absatz 3; Ansprüche 1-14; Beispiele 1-2 *	3	
A,D	----- EP 2 843 416 A1 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS [DE]) 4. März 2015 (2015-03-04) * Ansprüche 1-10 *	1-10	
A	----- DAVID L. MCGLASSON: "Using a Single Calibration Curve With the Anti-Xa Chromogenic Assay for Monitoring Heparin Anticoagulation", LABORATORY MEDICINE, Bd. 36, Nr. 5, 1. Mai 2005 (2005-05-01), Seiten 297-299, XP055381158, US ISSN: 0007-5027, DOI: 10.1309/HYCDUCQTV8YN145Y * das ganze Dokument *	1-10	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
A	----- EP 1 752 772 A1 (DADE BEHRING MARBURG GMBH [DE]) 14. Februar 2007 (2007-02-14) * Ansprüche 1-19 *	1-10	C12Q G01N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort Den Haag		Abschlußdatum der Recherche 14. Juni 2017	Prüfer Wiesner, Martina
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 17 15 1547

5 In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

14-06-2017

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2014207107 A1	31-12-2014	CA 2911873 A1	31-12-2014
		CN 105264385 A	20-01-2016
		EP 2818871 A1	31-12-2014
		EP 3014282 A1	04-05-2016
		HK 1220508 A1	05-05-2017
		JP 2016526676 A	05-09-2016
		US 2016326568 A1	10-11-2016
		WO 2014207107 A1	31-12-2014

EP 2843416 A1	04-03-2015	EP 2843416 A1	04-03-2015
		WO 2015028490 A1	05-03-2015

EP 1752772 A1	14-02-2007	AT 483164 T	15-10-2010
		CA 2555979 A1	12-02-2007
		DE 102005038418 A1	15-02-2007
		EP 1752772 A1	14-02-2007
		ES 2353808 T3	07-03-2011
		JP 5118321 B2	16-01-2013
		JP 2007052020 A	01-03-2007
		US 2007037236 A1	15-02-2007

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- EP 0034320 B1 [0005]
- EP 0004271 A2 [0005]
- WO 2012069139 A1 [0005]
- WO 2012175183 A1 [0005]
- EP 2843416 A1 [0013]
- EP 0034122 A1 [0049]
- US 4508644 A [0049]